

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-501851

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)3月3日

(51) Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/49	Z N A		
A 6 1 K 39/21	A D Y	9284-4C	
C 0 7 K 13/00		8517-4H	
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00
		9281-4B	5/ 00
			A
			Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 22 頁) 最終頁に続く			

- (21) 出願番号 特願平5-501040  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)6月10日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)2月10日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 4 9 8 0  
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 2 6 5 4  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)12月23日  
 (31) 優先権主張番号 7 1 4 , 1 5 2  
 (32) 優先日 1991年6月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

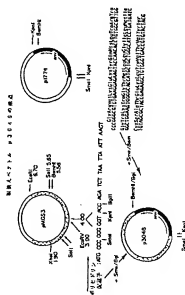
- (71) 出願人 マイクロジェネシス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 06450  
 メリデン リサーチ パークウェイ  
 1000  
 (72) 発明者 スミス ゲール ユーゲン  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 06605  
 ギルフォード ミッチェル ドライヴ  
 125  
 (74) 代理人 弁理士 石黒 健二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト免疫不全症候ウイルスに対する疫苗(ワクチン) および治療方法

(57) 【要約】 (修正有)

ヒト免疫不全ウイルス、および型1 (H I V - 1) の包被蛋白を含んだ慢性的免疫不全症候群(エイズ) ワクチンは、桿状ウイルス昆虫細胞ベクトル系においてクローニングしたH I V - 1 包被遺伝子から生産される。この組換えH I V - 1 蛋白は精製され、粒子状にされて卵殻アルミニウム補助剤に吸着される。このように補助剤に吸着された組換えH I V - 1 ウィールス包被蛋白形成物(エイズワクチン)は、動物においては高度に免疫活動が示され、H I V - 1 ウィールス外被に結合し、体外での実験ではウィールスの感染力を中和する。上述のエイズワクチンは、H I V - 1 感染者に対して新たな体就免疫反応および細胞免疫反応を誘発するから、ワクチン療法の一形態として免疫系の破壊を予防ないしは遅延させる上で有用である。



特許第6-501851(2)

請求の範囲

1. 細胞内HIV包膜蛋白を感染源に投与することを特徴とするヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
2. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、体重1Kg当たり毎日1マイクログラムから100マイクログラムを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
3. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日0.5μgから400.0μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
4. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日0.5μgから1280μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
5. 少なくとも3回の服用を投与されることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
6. 少なくとも6回の服用を投与されることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
7. 少なくとも各回の服用は30日から60日までの日数を隔てて投与されることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
8. 少なくとも各回の服用は30日から60日までの日数を隔てて投与されることを特徴とする特許請求の範囲第6項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
9. HIVに特異的細胞応答、あるいは体液免疫反応の増加を誘引する十分 quantity のHIV包膜蛋白を感染源に投与することを特徴とするヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
10. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
11. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。

を特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。

12. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
13. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日145.000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
14. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日145.000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
15. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日145.000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
16. 前記HIV包膜蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
17. 前記HIV包膜蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
18. 前記HIV包膜蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
19. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
20. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。

21. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
22. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、少なくとも毎日2.000.000の分子量を有する位に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
23. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、少なくとも毎日2.000.000の分子量を有する位に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
24. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、少なくとも毎日2.000.000の分子量を有する位に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
25. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、細胞膜と組み合わされていることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
26. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、細胞膜と組み合わされていることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
27. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、細胞膜と組み合わされていることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
28. 少なくとも毎日2.000.000の分子量を有する位に凝集した細胞内HIV包膜蛋白およびアルミ増強剤を含む組成物を感染源に投与することを特徴とするヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
29. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
30. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、細胞内gp160、細胞内gp120および細胞内gp41から選択され、細胞内HIV包膜蛋白は毎日145.000の分子量を有し、細胞内HIV包膜蛋白は誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。

31. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、gp160の毎日757個の複製アミノ酸を有し、gp160の毎日40個の複製アミノ酸を有する位に凝集することを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
32. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、毎日1μgから400μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
33. 細胞内HIV包膜蛋白およびアルミ増強剤を有し、該細胞内HIV包膜蛋白は少なくとも毎日2.000.000の分子量を有する位に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
34. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、細胞膜と組み合わされていることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
35. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、誘発ウイルス感染細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。
36. 前記細胞内HIV包膜蛋白は、gp160の毎日757個の複製アミノ酸を有し、gp160の毎日40個の複製アミノ酸を有する位に凝集することを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト免疫不全ウイルス感染症の治療方法。



クレンパ配列を示す。+1と+2264との間の3046 env DNA配列は、第4図に示す。

第4図ないし第4K図は、A c 3046 (+1と+2264との間の env 遺伝子の5' 端部における合成型リボ核酸配列とともにも示すHIV-1 env の実験的DNA配列である。内クレンパでの制限酵素の位置は、DNA配列の上に表示され、前述のアミノ酸配列はDNA配列の下に示されている。各基には左右に番号が付けられている。

第5図ないし第5K図は、A c 3046からのenv遺伝子の配列を強調したLAV-1からenv遺伝子の配列と比較する図である。LAV-1配列は、上方向に示れ、A c 3046の下方向に示れている。LAV-1配列の下方の線(1)には、A c 3046との相違点の位置では間違ってあることを示している。D N A配列の番号は、ワットソン・ホブソン(Watson-Hobson et al.)がLAV-1に対して記載したのと同一のものを用いている(図4、40:9-17(1985))

第6図は、ヒトHIV-1抗体陽性血清(上のグラフ)およびgp160(1J55、KL55)あるいはgp120(AB55、CD55、GH55)により免疫化された動物からのリン酸塩の血清(下のグラフ)についてのE L I S A 法による測定を示す。このE L I S A 法による測定は、高度に免疫化されたgp120とgp160の蛋白に対して測定される。特異に結合させた抗体は、半一度もヒトg H R P に対して測定された。本テストにより陽性反応を与える血清の最大数値は、測定である。

第7図は、ワクチン化した血清陽性患者についてgp160ワクチンが誘導する免疫反応を要した図である。

第8図(AおよびB)は、陽性なHIV抗体エピソードに対して直接行われるワクチン誘導免疫反応を示す。

第9図は、ワクチン化した血清陽性患者についてgp160に対するワクチン誘導した抗体増強反応を示す。

第10図(A-C)は、ワクチン化に伴うリンパ球増強反応を示す。

第11図は、反応者および非反応者におけるCD4細胞の経時的変化を示す。

結晶化gp120およびp14蛋白が含まれている。A c 3046は、本発明による免疫ペプチドの一例であり、結晶化免疫蛋白でもある。

#### 例1

アミノ酸1-757に対するHIV-1コード配列を有する様状ウイルス結晶化A c 3046の生成

様状ウイルスペプチドにおける真重免疫原コード配列は、一方ではポリドリン免疫促進子(Polyhedrin promoter)および上流の配列と同列になっており、他方では様状ウイルスのコード配列と異なって並んでいる。この配列においては、様状ウイルスの遺伝子と対応する結晶化は、ポリドリン免疫促進子および不溶性免疫遺伝子と並んでいる真重コード配列の転写を起す。

したがって、HIV-1包膜遺伝子の製造のために、多様な導入ペプチドが観察されている。導入ペプチドであるMGS3は、下記に述べたように、A T G 転写開始コドンで誘導するためのものである。このペプチドに真重配列を導入するに際しては、転写開始コドンにより生じた転写が真重配列を全体的に正しく誘導される状態で行われる。導入ペプチドMGS3は、塩基(Aque)を特異したA c M N P V 分離基から得られたD N A のE c o R I -1制限コドンから生成されたものである(W T -1)。このMGS3は、下記の構造的特徴を有している。

- 多価性遺伝子のA T G 開始コドンから上流側に4000 bpの配列がある。
- 位置均一的な免疫原性を有するMGS3配列を有し、多価性コドンに対応する位置に存在するA T G 開始コドン、制限位置Sma I、Kpn I、Bgl Iおよび同調停止コドン断片から成っている。
- 多価性遺伝子の内側であるKpn I制限位置からE c o R I -1制限コドンの末端E c o R I 制限位置に延びる1700 bpの配列がある(第2図参照)。

#### 例2

アミノ酸1-757に対するLAV-1 envコード配列を有する様状ウイルス結晶化の生成

第1図にNA2として示す結晶化プラスミドは、pUC18に導入された全体のHIV-1結晶化ウイルスの21、8 kb断片からなる。この特定の断片

#### 発明の要旨

結晶化HIV-1 gp160包膜蛋白("gp160")、とりわけ、結晶化アルミニウムなどが種動物に接種されたときとは、エイズワクチンとしては特に有効であることが判明している。この発明の一例では、結晶化コーン3046番に由来したアミノ酸1-757に基ずくHIV-1包膜遺伝子の結晶化に対するコード配列を有するA c N P V 免疫ペプチドを扱う。また他の例では、結晶化細胞内の結晶化HIV-1包膜蛋白(および重免疫蛋白)の製造に関する。とりわけ、アミノ酸配列1-757(すなわち3046)によりコードされたgp160蛋白を取り扱う。

本発明の他の例では、3046蛋白および、結晶化アルミニウムを養育するために3046断片の転写する結晶化様状ウイルスの遺伝子複製型から結晶化包膜蛋白の複製および純化を行うことを含んでいる。

本発明は、エイズおよびHIV感染に対する予防、治療ワクチンおよび、エイズおよびHIV感染に対する予防および治療方法をも含んでいる。

#### 発明の詳細な説明

次の例は、発明を限定するものではない。

結晶化様状ウイルス(カプセル化多価性ウイルス(A c N P V))は、HIV包膜蛋白(結晶化A c 3046)のよい例のHIV-1 gp160コードを含んでおり、このことは包膜液中中の特異性断片320、197号(断片では特異性断片355、260号)。結晶化様状ウイルス含有性血清を製造するために用いられるクロニングの手順は、先の説明に開示されている。ここにも文法として述べられている。

下記は、A c 3046包膜ペプチドを生成するために用いられる遺伝子技術の手順を詳細に記載したものである。ここに使用される物質は、特異免疫反応物を含有、市販されているものである。本発明の製造および応用にも記載されている。

典型的には、gp160として産生される他の結晶化包膜蛋白は、考慮され、

に感染してからウイルスとなることから、このコーンには、感染性とされている(アグチ等(dachi et al.)、結晶化ウイルス等、S9:284-291(1986))。NA2に含まれる完全包膜遺伝子配列は、HIVのLV層から誘導されたものである(バレー・シノー(Barr-Sinoussi)、1983)。

HIV-1の包膜遺伝子は、分離され、下記のように処理される(第1図参照)。この包膜遺伝子は、NA2から3846 bp E c o R I /S a c I 制限断片として産生は分離され、E c o R I /S a c I 制限位置pUC19にクロニングされる。この結果はプラスミドは、p708として決定される。包膜遺伝子は、その後に2800 bp Kpn I 制限断片として再度分離され、pUC18のKpn I 制限位置にクロニングされる。この結果生じたコーンは、p1614として決定される。

このp1614におけるKpn I 制限断片は、HIV-1包膜遺伝子の端に多い制限断片を含んでいるから、N-末端の1212 bpに対応する断片に先んじている。この断片は、結晶化の遺伝子は、特異的ペプチド配列を含有、二重鎖の異性体(ligomer)の導入により置き換えられている。導入された異性体は、通常の多価性遺伝子コドンを用いてLAV-1/結晶化から製造される。この遺伝子複製型を複製するために、A T G 開始コドンの代わりに新たなSma I 制限断片が同時に導入される。A T G 開始コドンは、様状ウイルス導入ペプチドにより供給される。この結果生じたプラスミドは、p1774として決定される。

第2図において、HIV-1包膜の様々な保護にコード配列を含むp1774からの制限断片は、クロニングされてMGS3導入ペプチド(第1図MGS3)となるから、導入ペプチドのA T G 開始コドンは、包膜遺伝子のコドンとともに組み込まれている。p1774の構造は、プラスミドペプチドMGS3のSma I /Bgl I の位置に導入されたp1774から分離されたSma I /Bgl I 制限断片から成っている。このコーンは、p16007/ミノ酸1-757に対する配列コドンを含み、MGS3ペプチドにより供給された結晶化コードを利用している。

#### 例3 結晶化様状ウイルスの製造および選択

HIV-1 *env* 遺伝子組換えプラスミド p3046 は、ACMNPV (W-1) とともに感染させた雄成体カシムカウで、卵巣巣状胚のスピンドル・ボディ・アゲル (*Spondoptera frogipera* 東京交配) の細胞に感染する。ついで、受精卵上の遺伝子発現を、相対遺伝子発現法で ACMNPV 遺伝子導入を検入する。組換えウイルスは、卵巣細胞核膜より核移行 (occurrence negative phase morpho ogy) により決定される。このような結果は、卵巣細胞核膜を示す、核の膜は破綻は起こさない。二回の追加的な感染原形質が繰り返されて、純粋な組換えウイルスを得る。組換えウイルスの DN A は、これらの核膜、遺伝子発現を野生のウイルスの DN A と比較することにより HIV-1 *env* 配列への挿入位置を特定するために分析される。

## 54

**感染したHIV virusの発現**

感染した宿主細胞内の複製サイクル

免疫細胞内の複製サイクルからHIV virus配列の発現により、結果的には第1次転写産物が生成される。この第1次転写産物は、超塩基対から形成されたココンプレックスにA<sub>3</sub>C<sub>3</sub>A<sub>6</sub>H<sub>8</sub>（図4）である。ポリメリン塩白蛋白と結合するRNA（例：g p 160）の上の転移転写複合体への下流に存在するヌクレオチドのAGアミノ酸に対する全てのミスマッチを修正する装置が生体される。第1次転写産物のものがA<sub>3</sub>C<sub>3</sub>A<sub>6</sub>H<sub>8</sub>（図4）が完了したA<sub>3</sub>C<sub>3</sub>アミノ酸で置換されたA<sub>3</sub>g<sub>2</sub>であるところの複製単位ではMet-Pr-F-O-Gly-A<sub>3</sub>-Gly-A<sub>3</sub>と改められ、Met-Pr-O-Gly-G<sub>2</sub>はコーニング技術の開発によって排除される。

## 85

g p 1 6 0 挿入子およびDNA両側のヌクレオチド配列  
DNA両側およびg p 1 6 0 挿入子のヌクレオチド配列は、ウイルス形質発  
現ベクターA c 3 0 4 6 DNAから分離された制限断片により決定される。かかる  
配列情報は下記の手順による。3. 9 k b のE c o R V - B a m H I断片は、A

c3046 ヴィールス形DNAの制限的取り込みにより複製される。このAc3046 ヴィールス形DNAは、ワクチン製造のために用いられた媒介細胞に存在する細胞がヴィールスから創成されたものである。

第2図に示すように、3, 9 kbのEcoRV-BamHI断片は、全部のg p160遺伝子、上流の100 bpおよび両側DNAの下流の約1000 bpからなる。このうち、全部のg p160のヌクレオチド遺伝子配列は、上流の100 bpおよび両側DNAの下流の1000 bpを含めて決定されている。

要するに、配列決定の結果、クローニング技術で予想したように仮定上の構造が現れた。gsp16の配列は、ワイン・ブソフン等(1985年)が報告した通りであった。転写開始点の位置と終端コドンとの間に存する2253基の配列により、75171ミルコドンおよび2028塩基N→N連鎖の糖鎖付加位置が予測された。このgsp16N決定因子は、既存の6種を含めて凡そ1,500,000である。DNA両側の200基の選択的解析により、第3区、第4区および第5区に示すように、正しい順序を示していることが分かる。

## P46

g p 180のアミノ酸配列

自動化したエドマン増延(Edman degradation)およびPCT法を用いて、g p 180の最初の15残基部分のN-末端部分のN-アミノ酸配列を調べた。それと一致と決定された。N-末端部分のメチオニンとは、g p 180の蛋白質には存在しない。このことは、A c N P V 多量体蛋白質がN-末端部分のメチオニン無しで生成されることと知見と理論的に整合する。結果、実際のg p 180 DNA およびN-末端部分の配列は、A c N P V 3046 DNA および複製されたg p 180の配列と一致したものと推定し、下記に示す。

考 1

AcNPV 3046 発現ベクトルにおける LAV env 遺伝子  
配列物

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Pro	Gly	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp

Gly  
ATG CCC GGG CGT GTC AAG GAG AAG TAC CAA CAC CTC TGG CGT TGG  
CGT

これらの結果を元のしんV-1のクローンと比較すると表2が導かれる。

表 2

元の LAV-1 のクローンにおける LAV *e* env 遺伝子

株番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1st	Val	Arg	Val	Lys	Gln	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp	Gly
2nd	ATC	AGA	CTC	ATG	GAG	AAG	TAT	CAG	CAC	TTC	TGC	AGA	TGC	CGC

## 47

**緑換えg p 160の精製**  
本発明の一断面においては、Ac 3046発芽ベクトルにコード化された緑換えH1V-1包膜蛋白を抽出して精製する製法が用いられている。緑換えH1V-1包膜蛋白g p 160は、Ac 160注入後4~5日間でS. フルギペルダ(S. frugiperda)の細胞内に生成される。g p 160の精製は、下記の手順でなされる。

1. 細胞の洗浄 2. 細胞溶解 3. ゲル浸透クロマトグラフィー 4. レンチル・レクチン (Lentil Lectin ; レンズ豆から得られるレクチン) 親和性クロマトグラフィー 5. 透析

本例は、 $2 \times 10^8$  個の A c 30-J6 の感染細胞から得られた超換元 g p 160 を複製する方法を記載している。

## 1. 相性の良さ

細胞懸液は、50 mMのトリス緩衝液 (Tris buffer pH 7.5)、1 mMのEDTAおよび1%のトリトンX-100を含む緩衝液により洗浄される。この緩衝液内で細胞が懸濁され通常の手法により均一化され、5000 rpmにより20分間遠心分離される。この手順を3回繰り返す。

- ## 2. 細胞培養

感染細胞は、50 mMのトリス塩緩衝液 (pH 8.0~8.5)、4%デオキシコレート (deoxycholate) および1%ペーラーメルカプタエタノール中で高功率波状 (sonication) により溶解される。この高功率波状は、通常の技術により行われる。高功率波状を行う直後は、核膜の残存物および細胞成分で覆い、これらは5000 rpmにより30分間遠心分離により取り除かれる。抽出されたg p 16.0を含む真至原溶液は、無菌状態の細胞で、光学顕微鏡による観察で確認

### 3. 参考文献

[illegible]

このピークは、高分子量の揮発および揮発混合物の析出により半導状態である。このピークには、蒸気相から抽出された  $g\ p\ 160$  の 10% から 20% が含まれている。明らかに、 $g\ p\ 160$  のこの部分は、自己と複合化され、あるいは他の成分と複合されて高分子量の析出物となっている。

第2の幅広いピークは、gp160の大半が含まれ、分子量が略18,000と200,000との間蛋白質を含んでいる。

第3のピークには、原料中のベータ-メルカプトエタノール ( $\beta$ -mercaptoeth

anol) のため、少量の蛋白が含まれているため、大半がUV吸収である。

UV吸収を記録した結果、第2のピークを最も顕著に検出したときには、ガラスカラムからの流出物は、レンチクル-レクチンカラム (lentil lectin column) に直接与えられる。第2のピークがガラスカラムから出たときには、流出物は、レンチクル-レクチン (lentil lectin) カラムから外し、そのまゝ集める。

4. レンチクル-レクチン (Lentil lectin) (レンズ豆から得た糖結晶性物質) は、レンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白 (Lentil Lectin-Sepharose 4B) は、最初から大量に投入される。レンチクル-レクチンは、セファドックス (クロマトグラフィ用担体粒子) (Sephadex) で親水性クロマトグラフィにより純度 98% 以上に分離される。ついで、シアリル糖基を有するセファロース 4B (Sepharose 4B) に結合させることにより固定される。この固定は、ゲル 1 ml に対して糖 2 mg のレンチクル-レクチン (ligand として) を含んでいる。レンチクル-レクチンカラムは、5.0 cm × 3.0 cm のガラスカラム (Pharmacia 社) で、1.25 ml のレンチクル-レクチン セファロース 4B (Lentil Lectin-Sepharose 4B) ゲル (高い分子重量を有する物質を低分子化するための濾過媒体) を含んでいる。この媒体は、完全に洗浄後に再び利用される。仕入れ先から保護された手法により再生産される。使用しない場合には、ゲルは、0.9% NaCl、1 mM MnCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、および 0.01% のチオサール (bisacryl) の溶液を含んだガラスカラム内に貯蔵される。このガラスカラムは、前述したようにに使用前に洗浄されて 2.5 ml のレンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白を含有される。

未処理の g p 160 は、既述のようにゲル透過法から抽出しているときに直接ガラスカラムに付着する。未処理の g p 160 が、このガラスカラムに接触されると、0.1% デキストラン (dexycholeate) を含む 80 ml のレンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白により洗浄される。このような状況下で、全ての g p 160 は、ガラスカラムに付着する。0.3 M の α-D-グルコース マノシドを含むレンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白により、付着したグリコ蛋白を溶離させる。これは、280 nm の波長域で UV モニターを介して観察される。

## 5. 過剰

### A. g p 160 粒子の構成成分

本発明の一面においては、純化工程の間に g p 160 の炭素は、分子量 2,000,000 以上の粒子から成っていることが判明した。この g p 160 の蛋白は、80~90% の単量体 (分子量 160,000) と 80~90% の多量体 (粒子状) の混合物として細胞から抽出された蛋白である。ゲル透過法により、g p 160 の混合物を取り除く。g p 160 の純化工程により (ゲル透過法によるカラム (column) における第1のピーク)、g p 160 は糖鎖結合性糖蛋白、あるいは糖鎖結合性糖蛋白の混合物を形成している。しかしながら、ゲル透過法によるカラムにおける第2のピークで g p 160 の炭素では、略 160,000~300,000 の分子量を有しているが、単量体もしくは二量体ではないことは実験的に示されている。

g p 160 の混合物や多量体は、レンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白、形成される。デキストランに対しては、2% 塩基性水溶液 (CMC) であるところの、0.5% のデキストラン (dexycholeate) 中のレンチクル-レクチンから分離したか、あるいは 0.1% のデキストラン (dexycholeate) 中のガラスカラムから分離したかによって、炭素の形態をとりとることが出来る。

結晶化のときは、高純度蔗糖 P L C 100-12 (Superose 12) カラム (Pharmacia 社) により行われる。純化された g p 160 の代表的試料は、ブルーデキストラン糖鎖結合性糖蛋白 2,000,000 に対しては、あるいは 80 倍の大きさを持つ。シュバラー (Schaller et al. 1989) による炭素の研究によれば、細胞内タンパク質に生じた g p 160 は、同様の 3 量体であることが判明している。この研究により、HIV 感染細胞およびウイルス粒子内の g p 160 は、3 量体であることも分かっている。こうして、炭素の HIV g p 160 に見られるのと同時に、結晶化 g p 160 の粒子も、第3元および第4元構造を有しているはずである。

過剰の第3元の構造は、g p 160 を新しく組み込むに必要なエドープの形成にとって重要である。炭素化蛋白は、工業工程において g p 160 の炭素への付着から取り除かれてレンチクル-レクチンカラムに付着するから、g p 160 の非親水性の蛋白は、分子内結合を形成し始める。炭素が、CMC 以上であ

過剰の過剰法により、種およびデキストラン (dexycholeate) が取り除かれる。1 ミクロンの感染細胞から得られた g p 160 の精製は、下記の表3のように要約される。

本発明の他の実施例では、ゲル透過法に代わって、通常のイオン交換クロマトグラフィ (陽イオン性および陰イオン性) が用いられる。また、本発明の原理はあまり重要ではない。例えば、ゲル透過法あるいはイオン交換クロマトグラフィがレンチクル-レクチン糖鎖結合性糖蛋白に代わってもよい。本発明により、他の炭素が用いられてもよい。例えば、結晶化蛋白に代わって、デキストラン (dexycholeate) の代わりに、他の炭素が利用されてもよい。これらは、Tween 20 (ポリサルベイト Polysorbate 20)、Tween 80、ラウロール (Lubrol) およびトリトン X-100 (Triton X-100) といった非イオン性の炭素が含有される。

表 3 純化工程の要約

純化工程	全蛋白 (mg)	g p 160 蛋白 (mg)	g p 160 の合計	除去された不純物
細胞破砕	1-2000	20	1-2	炭素媒体
1.2.3 回目の洗浄	250	15	6	脂質、脂質、大部分の炭素、可溶性糖蛋白
ゲル透過	120	12	12	脂質、炭素、高分子量の析出物
レンチクル-レクチン	14	10	70	非糖鎖結合性蛋白
過剰法	13	9	70	糖、デキストラン (dexycholeate)、過剰のトリスタン炭素

\* 全蛋白は、280 nm の吸収により評価される。

## 例 8

り、炭素が複合体を形成していることから、デキストラン (dexycholeate) は、g p 160 に結合しないであろう。本発明によって精製したことから、この炭素の成分が混合物になること、この蛋白自体の固有の性質である。g p 160 蛋白の極めて非親水性の N-末端配列成分が、このように、粒子形成上、蛋白の中性化に寄与すると考えられる。精製した炭素は、g p 160 複合体は、蛋白質を実質的に失うことなく、2 ミクロンのセルロースセサチオールから粒子形成に通過する。

### 粒子形成の分析

精製された g p 160 粒子の電子顕微鏡による分析結果では、30~100 nm の蛋白複合体の球形粒子であることが判明している。この粒子の存在について追加的な実験によれば、精製された g p 160 はゲル透過法により分析されたものである。100 ミクロンの g p 160 がスパーズ 12、PFLC ゲル透過法 R 10/30 カラム (Pharmacia 社) に加えられる。このカラムは、炭素は炭素付着基に由来するに起因している。このカラム (column) からの蛋白形成は、高度に再現性があり、炭素媒体は、蛋白溶液の分離に役立つ。このカラムにより単量体の g p 160 が多量体形成物から分離され、2 × 10<sup>4</sup> 以上の分子重量の球形蛋白を取り除く。このカラムにより処理されたものと全く同じ g p 160 は過剰で容易に分離はしない。このため、分子重量は 2 × 10<sup>4</sup> (2,000,000) 以上となる。

## 例 9

### A. g p 160 のアルミへの吸着

典型的な陽性電荷と、その不溶性炭素化合物の効果は、炭素の固相への吸着の能力に依存している。本発明の一面においては、アルミの炭素は、g p 160 アルミ複合体が炭素と対しての親和性を減少させない pH であり、g p 160 を炭素に吸着するようになっていることが判明している。このアルミ炭素 (銅アルミニウム) の形成工程で炭素と対する炭素は以下の通りである。

1. 炭素のアルミに対する吸着の最適 pH は 4.5 である。しかしながら、g p 160 は、pH 7.5 に対して pH 6.5 で吸着性を喪失することが分かっ

ているため、アルミは7、1±0.3のpH範囲で形成される。このpH範囲では100%のg p 160がアルミに吸着されることが判明している。

2. NaClから発生したイオン力は、比較的低く、0.15M以下である。  
3. 銅酸ナトリウムに比較して塩化ナトリウムはセロム透過性、表面汚染物には銅酸イオンが含まれていないことを示すのである。

4. g p 160は、新たに形成されたアルミに加えて精製成長を阻止し、粒子の大きさを最小にする。

以上の手順にて200mlのアルミを調整して精製されたg p 160に吸着させるので、沈降の最終濃度は下記の場合40g g/mlとなる。

B. 反応沈降調整 (200ml全量使用)

下記の溶液を調整して沈降液の100mlボトルないしはピーカーを用意する。ついで、塩を溶かし、溶液2および塩化ナトリウムに混合し、0.2ミクロンのセロースアセテートフィルターにより通過して後に、逆溶込みで沈降液の100mlボトルに採取する。

溶液1	AlCl <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.895グラム
	NaHASe · 3H <sub>2</sub> O	0.136グラム
投入のため、40mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)		
溶液2	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.234グラム
	投入のため、40mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)	
溶液3	NaOH	2.0グラム
	投入のため、100mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)	
溶液4	トリス (Tris)	1.25グラム
	投入のため、100mlの水に溶解 (WFI)。 90mlのWFIに1mlを加えて、0.5NのHClによりpHを7.5に調整してWFIを足して100mlにする。	

高圧室により各溶液を30分間処理する。低速撹拌動作。真室に冷却する。

## C. アルミの形成

1. 溶液1 (アルミニウム・ナトリウム・アセテート) を25mlの容量瓶で検い検でピペットを用いて基準用液の容器に加える。この際、溶液1の容量に留意しながら、溶液1を選択する。

2. 溶液2 (銅酸ナトリウム) を25mlの容量瓶で検い検でピペットを用いて基準用液の容器に加える。検い検を続けながら、析出させる。なお、この際、溶液2の容量に留意する。

3. 3mlの溶液3 (水酸化ナトリウム) を加え、5分間撹拌を続ける。0.5mlの試料を採取してpHを測定する。pHが7.0以下であれば、さらに0.5mlの水酸化ナトリウムを加えて、さらに5分間撹拌を続ける。再び試料のpHを測定する。この操作をpHが7.0と7.2の間になるまで繰り返す。

4. 基準用液の容器 (溶液1+溶液2+溶液3) に加えられるべき全量を決定し、正確な量のWFIを足して100mlにする。

5. 1mlトリスpH7.5の100ml内の純化g p 160を8.000マイクログラムを精度基準用液の容器に加える。

6. 20分間撹拌を続け、ついで基準フラスコを逆溶込み装置内に配合する。

## 例10

アルミ吸着g p 160の免疫能力 (再検Aと反応)

創設された抗原 (フタゲン) の免疫性を決定する一般的な方法は、一定量の抗原を単独または一群のネズミに投与する特定の抗体価を測定することである。投与から4週間後、ネズミからの抗体により、特定の抗原に対する血清の抗体レベルを例えばELISAといった標準試験により測定する。これに特定の抗原とは、通常の動物を免疫化させるのに用いる抗原である。また、ELISAは、Enzyme linked immunosorbent assay (酵素結合型免疫吸着試験) の略である。

再検されたg p 160のネズミに対する免疫性については、種別別検定pH6.0、およびpH7.5の場合、例9に記載のようにアルミ吸着の場合ならびにフロイント ( Freund) の完全補強液を混合させた場合に比べて、下記 (図4) のように顕著される。

表 4

試料	試料	中MELISA	血清抗体率
g p 160	補強剤	ロット	% (7/70) <sup>1</sup>
1 μg	無処理、pH7.5	8702	0.140 57%
	無処理、pH6.0	8702	0.110 26%
	アルミ	8702	1.000 90%
	アルミ	8705	2.285 100%
	フロイント	8804	1.108 83%
0.1 μg	フロイント	8702	1.396 100%
	フロイント	8804	0.434 67%
	アルミ	8705	1.003 67%

<sup>1</sup> ネズミは、免疫化後28日まで経過され、抗体特性化され、g p 160に対してELISA法室内で1:10の稀釈により血清が試験される。市販のELISA試薬 (エンテック社のELISA<sup>TM</sup> ELISA) を用いても、先述のHIV-1蛋白に対して1:400の稀釈の血清については、同様の結果が得られた。

<sup>2</sup> 全抗体数 (N) に対する血清抗体したネズミの数 (P) に対する比である。

1. 0.1マイクログラムの免疫剤のg p 160より免疫化されたネズミは、補助剤のなくとも表1に示すように、g p 160に対する抗体反応を誘発する。しかしながら、もっと有力な抗体反応は、アルミの補助剤を吸着したg p 160の1.0マイクログラム投与の場合である。フロイントの完全補強液を混合する場合はアルミにより誘発された場合で、g p 160の1.0マイクログラム以下の量投与では、免疫化されたネズミのうち血清抗体率が50%以上となることが分かる。g p 160の抗原は、pH7.5ないしpH8.0までの非酸性的抗原はほぼネズミにおける免疫能力がないが、塩pH7.5では免疫能力が失われる。

## 例11

アルミ吸着g p 160の免疫能力 (ELISA 血清研究)

抗原フタゲンが免疫反応を誘発する能力を有することは、極めて重要な生物学上の特性である。アルミにより調整したg p 160フタゲンが、動物に対して免疫能力を付与し、このアルミ補助剤が免疫能力を増強することを確認するために下記

の実験が行われた。

先ず項目である第9 (例9) には、10匹からなるネズミには、0.5 μg、1.0 μgあるいは5.0 μgのg p 160のみの投与、アルミ吸着g p 160の投与ならびに、フロイントの完全補強 (CFR) 試薬g p 160の投与がされた。28日経過後は、ネズミは投与により血清がELISA (例9: 1:10) を用いてg p 160に対する抗体の存在が検出された。

28日目に検定された血清からの結果は以下に示す表5に要約されている。全てのネズミにおいて、50%以上の血清抗体率が見られた。すべてが投与において、血清抗体率の数および平均血清抗体 (ELISA試薬で1:10稀釈でのOD<sub>490</sub>) の数は、アルミ吸着g p 160の方がg p 160のみで免疫化させたネズミよりも大きかった。

この結果は、アルミ補助剤が免疫g p 160抗原の免疫能力を向上させることを示している。

表 5 注入後28日経過

投与量0.5 μg	平均値	標準偏差	投与量1.0 μg	平均値	標準偏差	投与量5.0 μg	平均値	標準偏差
g p 160	0.07	0.07	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
g p 160 (Alum)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
g p 160 (CFR)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

## 例12

中性化試験

HIV-1中性化試験は、創設した抗体が、感染したヒトのリンパ球細胞にHIV-1ウイルスが感染するのを阻止するかどうかを決定するのに用いる一般的な手法である。g p 160で免疫化した動物からの反血清がHIV-1中性化

ば表中では隠され、その結果が下記の表6に要約されている。

56

動物	分類	免疫原/補助剤	マイクログラム*	中性化価 <sup>1</sup>
リーサス	GSS	gp120/Alum	15/8/3	1.80:1.160
リーサス	HSS	gp120/Alum	15/8/8	1.80:1.160
リーサス	LSS	gp150/Alum	16/8/8	≥1.80
ネズミ	Pool 3	gp120/freund's <sup>2</sup>	25/25/25	1.40:1.80
ネズミ	Pool 8	gp150/freund's <sup>2</sup>	1/1/1	1.40:1.80
モルモット (Guinea pig)	純粋化IgG	gp150/freund's <sup>2</sup>	10/10/10	1.320

\*: 第1回目、第2回目および第3回目に投与したg p 160およびg p 120のマイクログラム量を示す。

<sup>†</sup>: 非免疫化動物の血清に晒されたH7-1 感染細胞に比べて50%だけ感染阻止する反血清の最大価を示す。

モルモット (guinea pigs)、兎やマウス、アルビノあるいはフロイント (freund's) 補助剤を用いて gp 160 により免疫化された。一般にこれらの動

### 例 13

チンパンジーに対する免疫性

遺伝子的に見て、チンパンジーは人間に最も似ている近縁であり、今のところではH1N1感染の唯一の動物例である。

3匹のタンパンジャーにおける安全性/免疫性の実験では、二匹のタンパンジャーがアダム1調製ワクチンの $g p 160$ の $40 \mu g$ および $80 \mu g$ が免疫化された。これは、4週間間では、 $g p 160$ の $40 \mu g$ および $80 \mu g$ が慢性的免疫として設定された。残りの両用タンパンジャーは、 $1 ml$ の食塩水を投与した。血液試料は、通常に各タンパンジャーから分析し、 $g p 160$ およびHIV-1グリアス抗原に対する抗体を調べた。この結果は、二つの免疫試料、すなわち陽性 $g p 160$ に対する抗体マクロファージを介した (Mitsubishi, Inc.) による

とは、ここに記載するエイズワクチンに対するマクロフィージシス社の特許名である。米国政府のウイルスの複製量を測定する反-HIV抗体が陽性反応（タンパージュ）を生じているかどうかを判定するために、免疫学的検査がより適している。11週目経過の血清を試験した。この試験の際には、ワシントン州シアトル市所在のマクロフィージシス社の特許特許を有する反HIV1SA試験用の反HIV EIA-11試験キットが行われた。80名中のp16を投与されたタンパージュは、2週間目で1:100の稀釈で陽性であり、以後6週目まで抗体レベルが増加続けた。40名中のp16を投与されたタンパージュは、6週間目で1:100の稀釈で陽性であった。

## P14

g p 1 2 0 と g p 4 1 との間の特異性の分布  
 アクション選別度と g p 1 2 0 に対する抗体反応が、g p 1 2 0 4 1 あるいは g p 4 1 4 1 としてはこれら双方から示されるかどうかを確認することは重要深いことである。これら二種の抗体は抗原に対して多様な免疫応答を用いることにより、H I V - 1 包膜蛋白質の様々な構造に対して抗体分布を発生し定量化が行われる。この免疫応答はまた、急性性免疫応答 ( R I P ) 、 免疫寛容化 ( I F ) 、 ウェストン プロット分析 ( W B ) および重要な E L I S A 法などを用いてい

第6図は、異なる三種の組換え抗原に対する免疫活性を要するものである。異なる三種の組換え抗原とは、[ART] [TAB] (1) gp120-デルタ (分子のC-末端部からほぼ40個のアミノ酸が欠落している、さい頭形組換えHIV-1 gp120); [ART] [TAB] (2) (組換えHIV-1 gp120の全鎖長に属する); [ART] [TAB] (3) gp160を用いる。

HIV-1 抗体陽性の 50 名のヒトの血清、ならびにプールされた 3 名のヒトの血清は、gp150 に対しては高度に反応であり、gp120 に対しては種々かたまり、さいりょう形 gp120 に対しては抗体がほとんどないか、あるいはごく微量であった。さいりょう形 gp120 は、HIV-1 の外被糖鎖量の 90% 以上を占め、感染に対する決定因子を含んでいるようである。ヒトの免疫系性血清がこの感染

開発されたELISA試薬、ウェスタンブロット分析試薬 (Western Blot analysis) および市販のHIV-1 ELISA試薬をそれぞれ用いた。これらの分析結果を下図に示す。

A. ELISA (マグサチ HIV 160 (WSearch HIV 160))  
ELISA試験は、ELISA試験およびマグサチ HIV 160は、g  
p160に対する免疫反応を、これについては、本出願とともに出版文献中であ  
る、同一製造元とする特許出願第920,197号に記載されている（現在では  
特許出願第585,266号）。なお、マグサチは、米国、コネチカット州  
メリデンに所在するマイクロジェネシス社の商標名である。

免疫化する前、最初の免疫度の1:100に採取された血清試料は、1:10から1:100,000に稀釈され、ついで点滴(スポット)あたり100μgの純抗体p160を含むニトロセルロース片により増量した。この場合の純度点検は、山手の反ヒトIgGアルカリ・フェスファターゼ複合液で検出されたように、反p160抗体に対して陽性と示されたところの最も高い稀釈率であった。

対照用動物であるチンパンジー、および免疫低下した免疫前のチンパンジーの血液試料は、陰性であった。80 µgを投与したチンパンジーは、2週間目の1:100の稀釋で陽性であり、40 µgを投与したチンパンジーは、4週間目の1:100の稀釋で陽性であった。gp 160に対する抗体の生成は、4週目まで続けられ、この時点で終末点稀釋測定は、それぞれ1:100、0.00及び1:2、0.00、0.00にわたった。双方のチンパンジーにおける抗体濃度は、6~12週間にかけ徐々に減少した。

この種の反応は、人間のB型肝炎ウイルスに対してワクチン接種したチンパンジーに共通して観察される抗体反応と密接にも密接にも類似している。

## B. 市販のE.L.I.S.A.試験

グァタシン(GuaSyn)により免疫化されたチンパンジーの血清からのウエスタン  
ブロット分析、ならびにマグサーチ H1V 160 ELISA (WSeac  
h HIV 160 ELISA) から明らかなように、チンパンジーは血清転染され、超換  
え p16.0 に對して抗体を産するようになっていた。なお、グァタシン(GuaSyn)

蛋白領域に対してほとんど抗体を持っていないという所見は、ヴィールス感染に対する免疫反応が十分保護されないことや、通常の実験では、ヒトの陽性血清が低い中核化活性しか示さないことと符合している。

これに対して、gp160あるいは、さい形質gp120により免疫化したリ-  
ーナス糖では、さい形質gp120のHIV-1包膜蛋白に強く反応する抗体を  
有する。ウイルス包膜に結合抗体認識位置の分布の相違、ならびに強に見られ  
る比較的高い力価は、糖の濃度が高い中性化力価を有していることを説明してい

ヒトの血清および免疫リソース貧血血清におけるこれら三種の超換え型免疫抗原の免疫活性の量的評価は、第7図に示されている。gp160により免疫化した動物の血清を含み、試験した全ての量の血清は、おおよそgp120抗原 (gp120-デルタ) に対して高い凝固抗体を有していた。

この結果より、組換え gp 160 は、リヌス質では自然感染に生ずることの多い抗原反応とは異なる抗体反応を誘発することが判明した。これらは、免疫化した鼠に多く認察され、gp 160 の gp 120-デルタ領域にあるエプitoープであり、これらは感染中にはほとんどの免疫系には見られないものである。これらの新たなエプitoープは、H1V-1 に対する防壁にとって重要であり、H1V 感染に対する予防および処置上、組換え gp 160 の性質を確性とせう。

### 例15

30名のHIV血清陽性患者に対する臨床試験が行われ、HIV感染者個々に  
対してクローニングしたHIV gp160（既述したように、桿状ウイルス系  
により生成された）のワクチンの効果が決定的な。

経換え gp160 によるワクチン化により、30 名の HIV 血清陽性主観者のうちで 19 名の者 (63%) が、gp160 HIV 特異的抗体、細胞的反応において増加の傾向にあった。6 回分のワクチン投与を受けた 15 名の主観者のうち 14 名 (93%) が、全 gp160 抗体において増加を示した。したがって、経換え HIV 蛋白 (すなわち、gp141、gp120、gp160) およびこれらの混合物は、HIV 感染者を治療する方策上で、効果的に与えられたと



いゑよう。

本発明の實施例上、HIV蛋白の有効量は、下記に示す既知の技術に基づいて定められる。一般的に、このような有効量は、感染患者の体重 (kg) あたり  $1 \mu\text{g}$  から  $100 \mu\text{g}$  の範囲内にある。経腸のための投与回数についても、既知の方法で決定されよう。好ましくは、本発明の分野における通常の知識を有する者にとってはよく知られているように、非経口投与、すなわち静脈投与、筋肉内投与、歯肉内投与あるいは皮下注射などにより行われる。

#### A. 主顧客の選定

HIV感染者のうちの30名は近衛が罹患したものである。HIV感染初期の段階での血清陽性化反応は、ウェルターゴドの(Aalsterberg)疫病1年とほぼ等しいとされており、これらは、暴露からの有る程度待たせてみた。ウェルターゴドでは主に男性で、CD4+細胞は1年後に疫病2と、リンパ球(lymphoid pathy)が減少して主として、疫病4の値が約3ヶ月後に減少の40%を下回らないという(レドフバード等Redfield et al., ニュージャージー国立 ジョージナ大学雑誌, 314: 131-132 (1986))。追加的な研究結果は、18歳から50歳までの成人に限り、正常な対照集団の疫病、末梢神経の疾患など、全病変は1年経過後にたいてい正常もしくはほぼ正常であることがあった。結果は、任意抽出したグループから採り入れられた、2ヶ月の基準的検査法に一致した。試験中に対象疫病ウイルス (anti-retroviral) 薬剤による免疫抑制を減少させる効果は示されなかった。

30名の被験者のうち26名は男子で、4名が女子であった。このうち14名が白人（コカシアン）、13名が黒人では名がスペイン系であった。平均年齢は、2.9歳であった（1歳から4.9歳の年齢範囲）。登録資格者のうち8名は、ウェルターード(Walter Reed)病院1名、他の2名はウェルターード院障にであった。CD4の数値の平均均値は、666であった（388から1639の範囲）。最近診断された研究対象となまでにかかった平均期間は、2.4ヶ月であった（3ヶ月から4.9ヶ月の範囲）。

## B. ワクチンの製造および免疫化計画

既に説明したように、試験用ワクチンは、棒状ウイルス発芽組換え蛋白とし

でgp160から得た非感染サブユニット糖蛋白からなっている。免疫性蛋白は、*Trichinella* 腸虫組織から製造され、生物学的に純粋化され、最終的なワクチン処方のため滅菌アルミニウムに吸着された。

xp160の三つの投与効果が明らかになった。すなわち、ミッドランあたり40μmであり、ミッドランあたり160μmであり、ミッドランあたり320μmであった。注入量は、40μmおよび160μmの両方は1mlであり、640μmの投与ではミッドランあたり320μm2mlが認められた。

30名の観客者5人づつ6群に分かれた。計測Aと計測Bとの二つの反応性試験が実施された。計測Aは、ワクチン投与前日、30名は12日間分かれた。計測Bでは、ワクチン投与前日、30、60、120、150および180日に分かれた。各反応性試験(AあるいはB)内に、下記の表7に示すように、異なる5回のワクチン投与されその後の三回で完了した。全でのワクチンは、最初の注射により三角錠に増量された。単純接種スケジュールは10月7日までである。最初の2日は、基準接種であり、次の8日は基礎と追加の投与前日の測定評価である。

表 7 參照化計畫

計画日	計画日の投与量 (μg)						
	投与日	0	30	60	120	150	180
計画A							
第1群		40	40		40		
第2群		160	160		160		
第3群		640	640		640		
計画B							
第1群		40	40	40	160	160	160
第2群		160	160	160	640	640	640
第3群		640	640	640	640	640	640

## C. 安全性および毒性についての経緯

夢は半になかった。

身体での感染の発生および感染経路管理状況は、ならびに人体での感染経路を交通機軸テスト結果、もしくは量的CD4細胞の減少速度による計算では、免疫応答の影響の強弱に関しても、見逃されなかった。基本平均CD4細胞数は、ワクチン反応者では176番でワクチン反応者では65番であった。平均CD4細胞数は、実験日から180日、240日では、ワクチン反応者およびワクチン反応者で、それぞれ714番、561番であった。240日の実験中には、平均CD4細胞数の実質的変化は、ワクチン反応者ではマイナス0.2%であり、ワクチン非反応者では、3%の減少を見た(第11実験図)。ワクチンより効果は、れる月1%程度は、実験の全期間において被験者にCD4細胞の追加的な減少

ワクチン接種の結果、接種者中のHIVウイルス増殖およびウイルス負荷の増加を抑制するにあたっては、体内のウイルス活性は、血しょうの定量化、PBMCウイルス培養、PBMC-DNAポリメラーゼ連鎖反応およびp24抗原の血清レベルを測定することにより行われた。このウイルス培養およびDNAポリメラーゼ連鎖反応実験では、実験中変化は観察されなかった。血清p24抗原は接種者から検出されなかった。

## D. 零成長の経済

組換えによる製造ウイルス遺伝子 gp160、p66、p24ならびに H1V 原型の複製 MN の全長希薄ウイルスの双方を用いて、全 H1V 蛋白に対する抗体を製造した。トウビン等 (Toubin et al.) によりナショナルアカデミーサイエンス紀要 USA 76: 4350-4354 (1979) に記載されているように、フット プラット (foot blot) およびウェスタン プラット法 (Western blot) を利用した。特異的包被エピトープ抗体変態も測定された (第 4 図参照)。

第7図には、エピーブ88 (gp120中のアミノ酸88-98) および448C (gp120中のアミノ酸448-514) が選出された。これは、gp120の当該領域に対する抗体が初期のH1V感染と相関があると報告されているためである。

各志願者は投与後の第0日、第1日、第2日、第3日、第15日および第30日にそれぞれ至急に診察した。これらの各観測点に対しては、黒熱の発熱、寒熱、じくまき、吐き臭、四肢痛（関節痛のほら）、腫脹痛（筋肉のほら）、不快感、かつまた（皮膚の過敏性反応）、寒き込み、紅腫あるいは顔面について観察した。ワクチン注入による投与位置について簡明な反意を評する試験は、紅腫、腫れ、かき、痛み、発赤症、皮膚腫れ、皮膚荒れ、ツバツバの形成変化、注入場所の機能変化および注入位置の皮下層変化について行われた。月経の到来、血球数測定、血清の化学分析、結核菌および病原分枝について評価の行われた。

体内での細胞免疫応答が、T細胞の着床型（金井・伊藤、CD4、およびCD8の着床型）により評価される（ツリクマン等[Rickman et al.], 免疫応答性）  
25: 85-95、1989；Buller等[Buller et al.], 免疫応答性不均衡性  
部誌 4: 188-196、1991）。有糸分裂阻害剤（アリメタコバゲ）および  
コンカナバリン（Concanavalin A）（オナクニタニと生合成したオナクニタニ  
レクチン）および抗HLA抗体（カンジーダ アルビシン薬および免疫抑制薬）に  
対するT細胞の細胞免疫応答は抑制される（上述のレクチン）。対照薬（新薬  
部、破壊細胞キンド、カンジーダ アルビシン薬およびトリコフタル  
[trichostatin]）に対する遺伝性免疫応答テストにより、体内内の細胞免疫応答は抑制さ  
る。

※ 糸状血球単核細胞 (PBMC) および血しょうに關する重要なウイルス結果については、ブルケ等 (Burke et al.) が後天的免疫不全症候群の 3 : 1159 - 1167、1991 で記載された方法で評価された。DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (ワグズ等 (Wages et al.)), 基学的ウイルス学、33 : 58-63、1991) および血清 p 24 抗原レベルは、体内の HIV ヴィルス負荷の状態により評価された。

系統だった重症の出現は見られなかったが、局所的な反応活性は被実験対象者の87%に見られた(ワクチン投与群の13名)。局所的な反応活性は、組織硬結、反応過剰、注入位置での一過性皮下増大があり、局所的な炎症障害の悪化はほとんど観察されなかった。被験者のより増強した投与を拒んだ者はいなかった。局所所見の頻度については、最も多いのは、局部的投与、局所的投与と同様に

エドープ106 (g p120中のアミノ酸106-121)、241 (g p120中のアミノ酸241-272)、254 (g p120中のアミノ酸254-272)、300 (g p120中のアミノ酸300-400)、308 (g p120中のアミノ酸308-322)、422 (g p120中のアミノ酸422-454) および735 (g p120中のアミノ酸735-752) が測定された。これは、産上の機能的重要性から選ばれたものである。エドープ106および422は、C/D結合に結合するエドープ241、254および735は、B-領域の酸性性位に結合し、エドープ300および308は、B-領域の中性性位に結合している。

エドープ582 (7ミズイロ582-602) は、対照用として選定された。これは、H1Vの自然感染において免疫反応に起因しているからである。研究対象の適切なエドープには、49 (アミノ酸49-126) および342 (アミノ酸342-405) を含んでいる。

第7図に示すのは、陰影を付した印は、H1V包被特異免疫反応における変化を記録したものである。(+)の付した陰影印は、第1の免疫反応であり、(-)の付した陰影印は、第2の免疫反応である。また、(-)の付した印は、免疫反応の特異性エドープに対する免疫性を示すものである。(+)の付した印は、免疫反応の特異性エドープに対する免疫性を示すものである。この場合、免疫反応は特異性エドープに対する。一方、(-)の付した印は、g p160に対する免疫反応を示し、hは「高い背景値 (high background)」(制御不能) を示し、ndは「不発生 (not done)」を意味する。

中性化試験は、ラッセ (Rasse) によりエドープ1 (333:469-470、1988) に従って、多量免疫抑制剤材料において正確の測定法が報告されている。H1V-1118、R.FおよびH1V-1118に測定された。H1V特異性免疫反応は、g p160、p24およびp24と結合するウイルス抗原 (上述のp24のp24等による方法) を用いて適切なラッセ試験材料により測定した。

E. ワクチン反応をワクチン無反応者  
H1V包被特異エドープに対する免疫および免疫反応の両方の再生反応

的増加が一連のワクチン接種と関連があるときには、接種者はワクチン反応者のみに分類された (第7図参照)。ワクチンにより誘導された免疫反応は、H1V包被特異エドープに対する血清反応、あるいは包被特異エドープに対する第2の免疫反応として区別された。ワクチンにより誘導された免疫反応は、g p160に対する。新たな再生時、ワクチン接種後免疫反応の両方の再生として定義された。ワクチン反応者に対するこの区別は、本実験 (例: 感染免疫反応の有用性に関する詳細) の科学的目的の観点から、極めて合理的である。免疫反応も免疫増強反応も示さない接種者、あるいは免疫反応のみ、免疫増強反応のみを示さない接種者はワクチン無反応者として分類された。

F. ワクチンにより誘導された免疫反応  
第7図に示すように、接種者30名のうち19名 (63%) は、g p160特異性免疫反応および免疫反応の両方を示した。これらの接種者19名は、ワクチン反応者として分類された。11名のワクチン無反応者のうち4名は、免疫反応のみが免疫増強反応のみを示さない接種者。ワクチン接種された反応を抽出されなかった7名の全量については、3回の接種後引き継ぎなかった者であった (計入未定期)。H1Vゲリタラーゼ (p66)、糖蛋白 (p24) 遺伝子検査、あるいは非H1V対照用免疫反応に対する免疫反応に関する変化は抽出されなかった。これらの接種者により、抗体ウイルス、免疫反応の両方に対する免疫の発生は見られなかった。

包被特異 (g p160) の増加は、ウイルス全量中のH1V-MNを用いたウェスタン ブロット法により接種者の13名に生じた。この反応は、免疫反応に免疫を持っており、計入未定期は、15名の3名の接種者 (20%)、他では15名の10名の接種者 (67%) であった。計入未定期は、包被特異に対する免疫の増加をもたらした (p < 0.05、フィッシャーの二乗確率検定テストによる)。13名全量、特異性エドープ1に対して血清反応を示した。

順って、接種者のうち10名は、いかなる特異性エドープに対しても血清反応を示さなかった。ウェスタン ブロット法により包被特異に対する免疫増加を示さなかった。特異性エドープ1に対して血清反応を生じた8名の接種者は、ウェスタン ブロット法ではウイルス包被特異抗体の変化は生じな

った。どの接種者にも、非包被H1V蛋白に対する抗体の変化は見られなかった。計入未定期の6名の接種者のうち、15名の接種者のうち14名 (93%) においては、g p160に対する免疫増加を示した。これに対して、計入未定期の3名の接種者のうち7名 (47%) だけが、g p160に対する免疫増加を示した (p < 0.01、フィッシャーの二乗確率検定テストによる) (第7図参照)。

第8図に示すように、ワクチン接種前に対するワクチン接種後のg p160特異エドープの発生率は、下記の通りである。エドープ49では27-10パーセント、エドープ85では28-5パーセント、エドープ106では5-0-8パーセント、エドープ214では40-14パーセント、エドープ254では0-13パーセント、エドープ300では47-7パーセント、エドープ308では42-69パーセント、エドープ342では0-27パーセント、エドープ422では3-10パーセント、エドープ448では7-3-8パーセント、エドープ735では17-33パーセントであった。ワクチンにより誘導された血清反応は、582 (第7図) を除く全ての特異性エドープに見られた。エドープ241、254あるいは422に対する抗体 (血清反応) は下記の場合に抽出された。

二次的免疫反応は、次のエドープについて抽出された。すなわち、88、106、300、448および582である。エドープ582に対する免疫反応は、ワクチン接種前には10%であったが、接種者3名 (3%) のみが二次的免疫反応を示した。

包被エドープに対するワクチン接種後H1V反応の情報は、第7図に示すように多岐である。少なくとも一つのエドープに対する追加の免疫反応 (血清反応) は、20名の接種者に生じた。この内訳については、計入未定期は15名のうち51.4%であり、計入未定期は15名のうち60%であった (p < 0.05、フィッシャーの二乗確率検定テストによる)。計入未定期の接種者においては、血清反応を生じた者は、免疫反応にエドープ1に対する免疫を持っていないか110名のうち15名 (14%) だけであった。計入未定期の接種者においては、血清反応を生じた者は12.9名のうち60% (47%) だけであった (p < 0.0001、フィッシャー

の二乗確率検定テストによる)。3ないしそれ以上の包被エドープに対する血清反応は、計入未定期に生じた5名 (60%) に生じたが、計入未定期は2名 (13%) に生じたのみであった (p < 0.01、フィッシャーの二乗確率検定テストによる)。

三つの異なる免疫 (H1V-1118、MNおよびR.F) に対する血清免疫反応は、ワクチン接種後0日、9日および195日目の7名の接種者に生じた決定された。5名のワクチン接種者のうち4名は、1ないしそれ以上の免疫反応に対して強い免疫反応性を示した。このワクチン反応者は、ワクチン無反応者に比べて多量免疫反応を強く抑制する能力があることが見られた。

G. ワクチンにより誘導された免疫反応  
細胞免疫反応における変化は、ウィルコックス符号検定法 (Wilcoxon rank sum test) を用いて平均のワクチン接種前リンパ球数 (基準値 S1) と平均ワクチン接種後リンパ球数 (S2) との比較に基づいている。

接種者30名のうち21名 (70%) は、g p160免疫反応に生じた新たな免疫増強反応を記録していた (第7図参照)。

第9図は、典型的ワクチン反応者におけるg p160、p24およびp24と結合するウイルス抗原に対する免疫反応を示す。接種者全量において、g p160による免疫は促進され、平均ワクチン接種前リンパ球数 (基準値 S1) の3/4からS1の1.0にまで上げられていた (下記に免疫反応について4名の平均を算出)。これに対して、H1V p24あるいは非H1V抗原に対する免疫反応に比べて免疫反応は生じなかった。

接種者全量、ワクチン反応者により詳細に分類された接種者、ならびに免疫反応により部分分類された接種者において、ワクチンに誘導される平均 S1 値の変化は有意差がなかった (0.001、ウィルコックス、二乗確率検定テスト)。計入未定期 (6図参照) において誘導されるg p160に対する免疫反応は、計入未定期 (6図参照) において誘導されるg p160に対する免疫反応よりも大きかった (0.01、ウィルコックス、二乗確率検定テスト)。

21名の接種者のうち19名は、g p160に対して免疫反応を生じ、さら

に特異的反応を示した(ワクチン反応者)。g p 1 6 0 に対する最大平均リンパ球数(±S.E.)は、接種者全員において見られ、5.0、1.6を記録した。しかしながら、各ワクチン反応者の反応については、第7図に示すようにS.I.の頂上値が3から17.1の範囲に居ている如く様々であり、g p 1 6 0 に対する副反応のワクチンの大きさや特徴が一過性の関係にある如くである(第9図参照)。

#### H. 結果についての議論

本実験では、試験の大きさに限りがあったにも拘らず、数種の異なるワクチンの免疫能力に開示があった。計画Aでは接種者の15名中6名(40%)に対して計画Bでは接種者の15名中13名(87%)がワクチン反応者であった(第0.02 フィッシャー-ラン、二尾検定テスト)(第7図参照)。リッターあたり6.0よりも多い平均基準値のC/D4数を持つ接種者15名のうち13名(87%)は、ワクチン反応者であった。これに対して、リッターあたり6.0以下の平均値のC/D4数を持つ接種者14名では、そのうち6名(43%)がワクチン反応者であった(第4.07 フィッシャー-ラン、二尾検定テスト)。第8に要約したように、リッターあたり6.0以下の平均値のC/D4数を持つ接種者であっても、多量の免疫化能力により免疫能力が改善することが分る。例えば、計画Bにおいては接種者5名のうち5名(60%)がワクチン反応者であるのに対して、計画Aにおいては3回投与では接種者8名のうち1名だけがワクチン反応者に対する(第0.02 フィッシャー-ラン、二尾検定テスト)(第8図参照)。

表 8

基準値C/D4に基づくワクチン免疫反応性および免疫化計画			
C/D4	反応者(N)	免疫化者(N)	免疫化率(%)
計画A			
>6.0	7	5 (71%)	2 (29%)
5.0-6.0	5	1 (20%)	4 (80%)
<5.0	3	0 (0%)	3 (100%)
合計	15	6 (40%)	9 (60%)

を与えるであろう。

血清中抗体活動についての体内免疫反応は現在では未知であるが、5名のワクチン反応者の4名について、個々のエディトープ種(11B、R、F、M、N)に対する強い中抗体活動を観察する。感染後の免疫化が抗体の機能性変化を誘導することを示すだろう。試験上のワクチンは、個々のエディトープ種に対して血清中抗体能力を増加させ、最終的に特異的中抗体エディトープを明確にする上で有効な可能性がある。

H I V 感染による増殖的反応は、自然のH I V 感染ではほとんど起こらない。しかしながら、g p 1 6 0 による免疫化した後は、特異的T-細胞増殖反応が起こることが、21名の接種者(70パーセント)において記録された。このような増殖が生ずることの理由については明らかでない。一つの可能性としては、ワクチン中に有る包膜エディトープに対して新たな増殖的反応が起こることが可能である(ワクチン製造方法、あるいは体内免疫反応の代替の結果として)。もしくは、増殖促進で誘引された場合が、自然ウイルスの初期(野生型)包膜エディトープに対して初期のT-細胞増殖反応を利用しないことが考えられる。しかしながら、増殖促進効果ではあるが、ワクチン化がヒトの細胞免疫反応を促進することが判明している。選ばれたワクチン反応者によれば、免疫化後のH I V 1 1 B 特異的細胞増殖率とT-細胞数を示した。

H I V 感染におけるワクチン反応性を要する要因については、これから明らかにすべきことである。初期段階のH I V 感染者であっても、相当の対策手段に比較して種々のワクチンには迅速に反応する。この高い反応性は、初期のB細胞に抑制不全とT-細胞の機能不全とに関連している。ワクチン免疫反応性は、基本C/D4細胞数に開示しており、このことは免疫状態はワクチン反応の重要な決定因子であるとの仮説と符合している。しかしながら、特異的T-細胞数の変化範囲内での免疫化計画は、ワクチン反応に影響を及ぼした。計画B(6回投与)の場合は、逆であった。C/D4細胞数が少ない場合には接種者に免疫反応性が低下するが、この低下はワクチン投与回数を上げることにより改善の可能性があった。このことは、さらにワクチン投与回数、量、濃度、補助剤あるいは処方改良如何によりヒトの免疫性が改善されることを示している。

計画B			
>6.0	9	8 (89%)	1 (11%)
5.0-6.0	2	2 (100%)	0 (0%)
<5.0	4	3 (75%)	1 (25%)
合計	15	13 (87%)	2 (13%)

全合計	30	19 (63%)	11 (37%)
-----	----	----------	----------

ワクチンの適切な利用は、急性性免疫反応に対する治療法として19世紀にバズールによって紹介された。しかしながら、他の感染に対する結果については、このような方法での研究は広範に示されていない。A型およびB型肝炎感染に対する結果のように、ウイルス特異的免疫の事理的基礎原理についての結果は興味あるものの、確認もしくは慢性ウイルス感染に対しては、免疫治療の有効利用により人間に対する広範な研究は限られた。

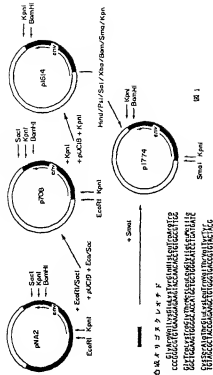
本実験では、感染後に免疫化によりウイルス特異的免疫付与療法を提供する。とりわけ、H I V 遺伝子型から導き出されたg p 1 6 0 に対するワクチンにより、H I V 感染初期患者の3名中1名が、ヒトに対するウイルス特異的免疫治療反応および細胞反応を増加させた。

本研究により、自然感染と免疫化における特異的H I V エディトープに対する抗体反応の性質が質的および量的の両方から測定できた。このようにして、感染後のワクチン免疫反応免疫化反応性についての正確な定数、接種者の70%に対して系統的に記録された。例えば、20名の接種者(19名はワクチン反応者、1名はワクチン無反応者) 特異的包膜エディトープに対して血清反応した。ワクチンのみに開示する血清反応(エディトープ2.4、2.5.4および3.4.2)は、1.0名の接種者に発生した。

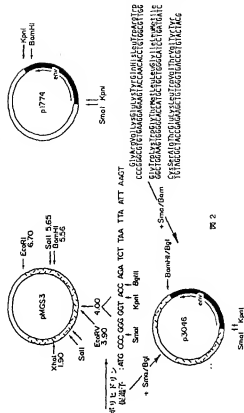
さらには、このワクチンに対する免疫化の反応は、エディトープ種類により特異づけられるように、特異的抗体反応の因果関係について見込みのある調査を提供し、自然感染からでは導き出されない免疫制御要素を特徴づける有効な機会

H I V 感染中に強制的に免疫化する際のH I V 特異的ワクチン製品に対する安全性について基礎となるもの、免疫に特異的な毒性を証明する情報はなかった。量的効果、DNAポリメラーゼ連鎖反応法、ならびに血清抗体試験によれば、体内でのH I V 負荷の増加を見た。選ばれたH I V 両性の体内免疫とC/D4細胞の減少率により、とりわけワクチン反応者と分類された接種者の間で有意な影響を受けた有数の見られた。ワクチン反応者に対する平均C/D4細胞数の変化は、-0.24で、ワクチン無反応者では-7.34であった。これらの資料は、感染後免疫化の反応性はC/D4細胞数の減少に開示する。体内のH I V 免疫低下に開示していることを示している。

本研究でのワクチン接種の結果は、感染する年齢、人種および基本C/D4細胞数における1.0名の感染、不感染のヒトのデータベースに比較された。この比較において平均C/D4細胞数が、7%減少すること、接種人に認められた接種者では、2%の減少に相当し、計画Bに認められた接種者では、0.6%の減少に相当する。これらの結果からは、感染後H I V 包膜蛋白による感染後ワクチンは実用であり、さらには当該ワクチンの感染予防的効果に開示して有望であることを示していることが分る。



● 補えベクトル p3046の構造



Ac3046 x p160 コード配列の両側に位置するDNAのヌクレオチド配列

TGCTGATATC ATGGAGTAA TTAAATAT AACCATCTCG CAATATAA  
+100

AGTATTTTAC TGTTCGTA ACAGTTTGT AATAAATAA CCTATAATA

ATG ----TGCAG/----TATTTAATTA GT ACC GAC TCT GCT GAA GAG

GAG GAA ATT CTC CTT GAA GTT TCC CTG GTG TTC AAA GTA AAG GAG

TTT GCA CCA GAC GCA CCT CTG TTC ACT GGT CCG GCG TAT TAA

33

また、サード世界および予備される3046の創設及び構造のアメリカ

224

事實とも示す：

Year	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100
1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	







[illegible]

244

24 1 0

[illegible]



開口波取り構成ベースの数: 2253  
7ミノ波コドン数: 3253 + 3 = 753

アミノ酸	数	分子量	合計
GLY	53	75.1	3,989.3
GLU	42	147.1	6,031.1
ASP	28	133.1	3,737.5
VAL	45	117.1	5,269.5
ALA	37	89.1	3,296.7
ARG	30	174.1	5,230.8
SER	38	105.1	3,989.3
THR	42	146.2	6,149.4
ASN	58	133.1	7,661.8
PRO	17	146.2	2,485.8
ILE	53	131.2	6,952.3
TRP	24	204.2	4,899.2
CYS	23	121.2	2,787.6
LEU	14	146.2	2,046.8
GLN	25	146.2	3,655.0
PRO	23	105.1	2,417.3
GLN	11	146.2	1,608.2
PRO	11	133.1	1,464.1
合計	751		94,342.4 (751 × 126)

非糖化位置の合計数  
28 × 2100 (オリゴ糖あたり分子量)  
8160の合計算出分子量  
= 84,826.4  
= 84,826.4 + 58800  
= 143,626.4

LAV-1と組換えAC3046 PEG6000との比較  
LAV-1と組換えAC3046 PEG6000との比較  
LAV-1と組換えAC3046 PEG6000との比較

アミノ酸	数	分子量	合計
GLY	53	75.1	3,989.3
GLU	42	147.1	6,031.1
ASP	28	133.1	3,737.5
VAL	45	117.1	5,269.5
ALA	37	89.1	3,296.7
ARG	30	174.1	5,230.8
SER	38	105.1	3,989.3
THR	42	146.2	6,149.4
ASN	58	133.1	7,661.8
PRO	17	146.2	2,485.8
ILE	53	131.2	6,952.3
TRP	24	204.2	4,899.2
CYS	23	121.2	2,787.6
LEU	14	146.2	2,046.8
GLN	25	146.2	3,655.0
PRO	23	105.1	2,417.3
GLN	11	146.2	1,608.2
PRO	11	133.1	1,464.1
合計	751		94,342.4 (751 × 126)

図 4 f.

[illegible]

9 5 6

[illegible]

310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

55

[illegible]

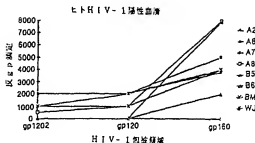
1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504	2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513	2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540	2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567	2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576	2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648	2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684	2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693	2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702	2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711	2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720	2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729	2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738	2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747	2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756	2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765	2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774	2775	2776	2777	2778	2779	2780	2781	2782	2783	2784	2785	2786	2787	2788	2789	2790	2791	2792	2793	2794	2795	2796	2797	2798	2799	2800	2801	2802	2803	2804	2805	2806	2807	2808	2809	2810	2811	2812	2813	2814	2815	2816	2817	2818	2819	2820	2821	2822	2823	2824	2825	2826	2827	2828	2829	2830	2831	2832	2833	2834	2835	2836	2837	2838	2839	2840	2841	2842	2843	2844	2845	2846	2847	2848	2849	2850	2851	2852	2853	2854	2855	2856	2857	2858	2859	2860	2861	2862	2863	2864	2865	2866	2867	2868	2869	2870	2871	2872	2873	2874	2875	2876	2877	2878	2879	2880	2881	2882	2883	2884	2885	2886	2887	2888	2889	2890	2891	2892	2893	2894	2895	2896	2897	2898	2899	2900	2901	2902	2903	2904	2905	2906	2907	2908	2909	2910	2911	2912	2913	2914	2915	2916	2917	2918	2919	2920	2921	2922	2923	2924	2925	2926	2927	2928	2929	2930	2931	2932	2933	2934	2935	2936	2937	2938	2939	2940	2941	2942	2943	2944	2945	2946	2947	2948	2949	2950	2951	2952	2953	2954	2955	2956	2957	2958	2959	2960	2961	2962	2963	2964	2965	2966	2967	2968	2969	2970	2971	2972	2973	2974	2975	2976	2977	2978	2979	2980	2981	2982	2983	2984	2985	2986	2987	2988	2989	2990	2991	2992	2993	2994	2995	2996	2997	2998	2999	3000	3001	3002	3003	3004	3005	3006	3007	3008	3009	3010	3011	3012	3013	3014	3015	3016	3017	3018	3019	3020	3021	3022	3023	3024	3025	3026	3027	3028	3029	3030	3031	3032	3033	3034	3035	3036	3037	3038	3039	3040	3041	3042	3043	3044	3045	3046	3047	3048	3049	3050	3051	3052	3053	3054	3055	3056	3057	3058	3059	3060	3061	3062	3063	3064	3065	3066	3067	3068	3069	3070	3071	3072	3073	3074	3075	3076	3077	3078	3079	3080	3081	3082	3083	3084	3085	3086	3087	3088	3089	3090	3091	3092	3093	3094	3095	3096	3097	3098	3099	3100	3101	3102	3103	3104	3105	3106	3107	3108	3109	3110	3111	3112	3113	3114	3115	3116	3117	3118	3119	3120	3121	3122	3123	3124	3125	3126	3127	3128	3129	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	3140	3141	3142	3143	3144	3145	3146	3147	3148	3149	3150	3151	3152	3153	3154	3155	3156	3157	3158	3159	3160	3161	3162	3163	3164	3165	3166	3167	3168	3169	3170	3171	3172	3173	3174	3175	3176	3177	3178	3179	3180	3181	3182	3183	3184	3185	3186	3187	3188	3189	3190	3191	3192	3193	3194	3195	3196	3197	3198	3199	3200	3201	3202	3203	3204	3205	3206	3207	3208	3209	3210	3211	3212	3213	3214	3215	3216	3217	3218	3219	3220	3221	3222	3223	3224	3225	3226	3227	3228	3229	3230	3231	3232	3233	3234	3235	3236	3237	3238	3239	3240	3241	3242	3243	3244	3245	3246	3247	3248	3249	3250	3251	3252	3253	3254	3255	3256	3257	3258	3259	3260	3261	3262	3263	3264	3265	3266	3267	3268	3269	3270	3271	3272	3273	3274	3275	3276	3277	3278	3279	3280	3281	3282	3283	3284	3285	3286	3287	3288	3289	3290	3291	3292	3293	3294	3295	3296	3297	3298	3299	3300	3301	3302	3303	3304	3305	3306	3307	3308	3309	3310	3311	3312	3313	3314	3315	3316	3317	3318	3319	3320	3321	3322	3323	3324	3325	3326	3327	3328	3329	3330	3331	3332	3333	3334	3335	3336	3337	3338	3339	3340	3341	3342	3343	3344	3345	3346	3347	3348	3349	3350	3351	3352	3353	3354	3355	3356	335
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----

642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135
642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135
642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135
642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

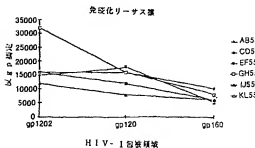
59

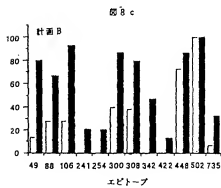
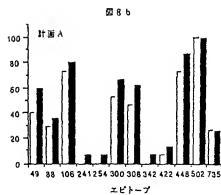
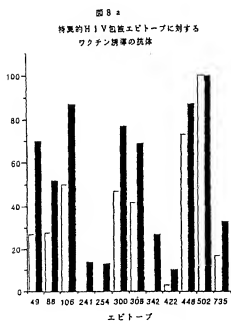
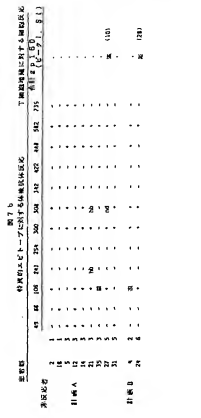
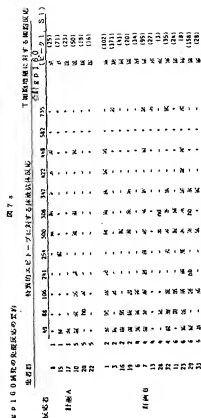
[illegible]

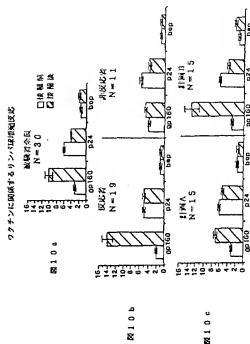
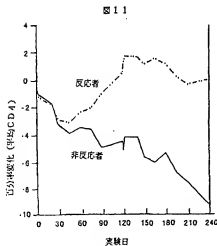
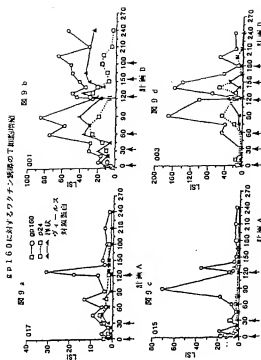
46



6.2





[illegible]

